



Capillary gas chromatography with cryogenic oven temperature for headspace samples : analysis of chloroform or methylene chloride in whole blood

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 加奈子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1588

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 3 1 1 号	学位授与年月日	平成 1 1 年 1 0 月 8 日
氏 名	鈴 木 加奈子		
論文題目	<p>Capillary gas chromatography with cryogenic oven temperature for headspace samples:analysis of chloroform or methylene chloride in whole blood (ヘッドスペース試料に対する低温オープンキャピラリーガスクロマトグラフィー:全血中クロロホルム及びメチレンジクロリドの分析)</p>		

博士(医学) 鈴木 加奈子

論文題目

Capillary, gas chromatography with cryogenic oven temperature for headspace samples : analysis of chloroform or methylene chloride in whole blood

(ヘッドスペース試料に対する低温オープンキャピラリーガスクロマトグラフィー：全血中クロロホルム及びメチレンジクロリドの分析)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

法医学の分野においてしばしば事故、自殺、殺人などにおけるクロロホルム、メチレンジクロリドの中毒死例が報告されている。過去にこれら薬物をヘッドスペース(HS)抽出ガスクロマトグラフィー(GC)法で分析した報告がある。これらは従来のバックドカラムを用いており、感度、分離能とも優れない。ワイドボアキャピラリーカラムを用いた例でも、HS気相サンプルを0.1-0.5mlしかGCへ注入できない。ミドルボアキャピラリーカラムを用いた例では実質注入量100分の1程度のスピリットモードを用いており、特に高感度を期待できない。

現在purge and trap抽出法とGC分析との組合せが、環境水や固体試料を大容量用いる事が可能であるため、最も感度的に優れた分析法といえる。しかし、試料の抽出過程において大量の泡沫を発生させるために、血液や組織ホモジネートといった高蛋白液体試料には不適である。

近年、新しいタイプのGC機器に液化炭酸ガスポンペを装着し、マイクロコンピューター制御により、GCのオープン温度を迅速かつ正確に0℃以下の低温に冷却する事が可能となった。これは一度高温にしたカラム温度を液化炭酸ガスで急速冷却する事で、測定時間を短縮させる事を目的として開発されたものであった。今回我々は、冷却したオープンによって、気体クロロホルムとメチレンジクロリドを、ロスなくミドルボアキャピラリーカラムヘトラップし、ヒト血中クロロホルムとメチレンジクロリドを高感度で検出する事を試み、良好な結果を得た。

〔材料ならびに方法〕

上記2種化合物の一方を測定する際には、もう一方を内部標準物質として用いた。

まずヒト全血0.5mlと5 μ g/0.5ml全血に濃度調整したクロロホルム又はメチレンジクロリド水溶液0.5mlを7mlのスクリーキャップバイアルに入れ良く混和し、バイアルをヒートブロックにて55℃、20分間加熱する。その後ガラスシリンジでHS気体サンプル5mlを抜き取り、直ちにその全量を-30℃に冷却したカラムへ導入、GC分析を行う。

今回の分析では、カラムの初期温度は-30℃、ヘリウム流量3 ml/min、注入口温度250℃、検出口温度280℃、1分間のスプリットレスモードの後、スプリットモードに切り替えて、-30℃から100℃まで毎分10℃昇温、100から280℃まで毎分20℃昇温を行った。

〔結果〕

まず、ヒト血中からの両薬物のHS抽出法における加熱時間につき、10、20、30分と検討した結果、20分が至適時間であった。

次にRtx-Volatilesキャピラリーカラムによる低温分析を行う際のカラム初期温度を0、-10、-20、-30、-40℃について検討した。低温になる程ピークはシャープになったが、-40℃ではバックグラウンドにノイズが出現したため、カラム初期温度を-30℃に設定した。

分析の結果、回収率はクロロホルムでは $11.5 \pm 1.3\%$ (mean \pm SD, $n = 5$, CV = 11.4%)、メチレンジクロリドでは $20.0 \pm 1.8\%$ (mean \pm SD, $n = 5$, CV = 9.0%)と良好であった。

5 μ gのISを含む0.5mlの全血にクロロホルム又はメチレンジクロリド水溶液0.5mlを添加し、検量線を作成した結果、いずれも良好な直線性を得た($r \geq 0.993$)。

5 μ gのISに対して0.01 μ g/0.5mlという微量濃度の両薬物について分析を試みたところ、いずれもシャープなピークが得られ、検出限界は2 ng/0.5ml全血であった。

本法の再現性を検討するため、両薬物各々について日内変動、経日変動も検討した。その結果、日内変動、経日変動とも、クロロホルム、メチレンジクロリド両薬物について良好な結果を得た(CV $\leq 9.0\%$)。

両薬物各々でラットに深麻酔を施し腹大動脈から採取したラット全血を定量した結果、クロロホルム 0.79 ± 0.59 mg/ml、メチレンジクロリド 1.27 ± 0.35 mg/ml(各 $n = 5$)であった。

〔考察〕

今回の分析で使用したカラムは、メーカーの設定では使用許容温度範囲が0-280℃であるにもかかわらず、-30℃にて3ヶ月の間、実験に対して十分に耐久性があり、再現性にも問題は生じなかった。グラフ上の両薬物のピークはシャープで、分離能も優れていた。不純ピークも殆ど見られなかった。両化合物間で回収率に差を認めるのは、HS抽出過程において、気相-液相間の分配係数が物質により異なる事によるものと思われる。過去の報告にある、バックドカラムを用いたGC-FIDによって分析した血漿中のクロロホルムの検出限界が0.9 μ g/mlである事を考慮すると、今回の分析における検出限界は4 ng/mlと大変優れている。本法が感度、分離能ともに優れるのは、カラムを低温にする事で、HS抽出において気体分子となった両化合物が低温のカラム入り口で液状となり、カラム入り口の狭い範囲へ凝集し、ロスなくトラップされるためであると考えられる。

〔結論〕

今回我々は、ヒト血中の微量クロロホルム、メチレンジクロリドを高感度に検出する新しい方法を開発した。液化炭酸ガスポンペをGC機器に装着し、カラムを-30℃にまで冷却する事でHS気体サンプル5 mlをロスなくカラムへトラップする事ができ、両化合物ともシャープなピークが得られ、不純ピークも殆ど見られなかった。回収率、検量線、検出限界、再現性いずれも大変良好な結果を示し、飛躍的に感度を向上させる事ができた。

論文審査の結果の要旨

薬毒物には揮発性物質と難揮発性物質がある。揮発性物質は通常気化平衡法(ヘッドスペース法; HS)によって血液等から気体として抽出し、その気体をガスクロマトグラフィ(GC)装置に注入する。従来のGC法では注入量に制限があり、バックドカラムでは約0.5ml-1.0ml気体、ワイドボアキャピラリーカラムでは0.1-0.5ml程度の気体しか注入できないため、高感度が得られなかった。

近年、新しいタイプのGC機器に液化炭酸ガスポンペを装着し、マイクロコンピューター制御により、GCのオープン温度を迅速かつ正確に0℃以下の低温に冷却する事が可能となった。この装置は本来一度高温にしたカラム温度を急速冷却する事で、測定時間を短縮させる事を目的として開発されたものであった。今回申請者は、この冷却方式を別の目的に使用した。すなわち、-30℃に冷却し、それによって気体クロロホルムとメチレンジクロリドを高感度に検出する事を試み、成功した。現在この方法をcryogenic oven trappingと名付け、他の揮発成分分析に応用しつつある。今回のヒト血中クロロホルムとメチレンジクロリドの分析法に関する研究では次の様な実験、検討を行った。

- 1) ヒト血中からの両薬物のHS抽出法における加熱時間を10、20、30分と検討した結果、20分が至適時間であった。
- 2) Rtx-Volatilesキャピラリーカラムによる低温分析を行う際のカラム初期温度を0、-10、-20、-30、-40℃につき検討した結果、低温になる程ピークはシャープになったが、-40℃ではバックグラウンドにノイズが出現したため、カラム初期温度を-30℃に設定した。
- 3) 両薬物の抽出効率、クロロホルムでは $11.5 \pm 1.3\%$ (mean \pm SD、n=5、CV=11%)、メチレンジクロリドでは $20.0 \pm 1.8\%$ (mean \pm SD、n=5、CV=9.0%)と良好であった。
- 4) 定量のため5 μ gの内部標準物質(IS)に対してクロロホルム又はメチレンジクロリド水溶液0.5mlを添加し検量線を作成した結果、いずれも0.05-5 μ g/0.5mlの範囲で良好な直線性を得た($r \geq 0.993$)。
- 5) 高感度の追求の為、0.01 μ g/0.5ml (IS: 5 μ g)の微量濃度の両薬物について分析を試みたところ、いずれもシャープなピークが得られ、検出限界は2 ng/0.5ml全血であった。
- 6) 本法の再現性を検討するため、両薬物各々について日内変動、経日変動も検討したところ、いずれも良好な結果を得た(CV \leq 9.0%)。
- 7) 本分析法の適用例として、両薬物各々でラットに深麻酔を施し腹大動脈から採取した全血中の両化合物を定量した結果、クロロホルム 0.79 ± 0.59 mg/ml、メチレンジクロリド 1.27 ± 0.35 mg/ml (n=5)であった。

過去の報告にあるバックドカラムを用いたGC-FID(水素炎イオン化検出器)によって分析した血漿中のクロロホルムの検出限界が0.9 μ g/mlである事を考慮すると、今回の分析で得られた検出限界は2 ng/0.5mlと大変優れている。本法が感度、分離能ともに優れるのは、カラムを低温にする事で、HS抽出において気体分子となった両化合物が低温のカラム入り口で液状となり、カラム入り口の狭い範囲へ凝集し、ロスなくトラップされるためであると考察した。

以上の事から、申請者は低温オープンGCを用いる事によって、ヒト血中の微量クロロホルム、メチレンジクロリドを高感度に検出する新しい方法を開発した。両化合物ともシャープなピークが得られて、不純ピークも殆ど見られず、抽出効率、検量線、検出限界、再現性いずれとも大変良好な結果を示し、飛躍的に感度を向上させる事ができたと結論した。

この発表の際、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) スプリットとスプリットレス注入法について
- 2) 加熱時間を55℃に設定した理由について
- 3) 注入口を250℃に設定した理由について
- 4) 今回使用したFID検出器に適する分析対象物質とFIDの原理について

- 5) 低温分析によってもたらされる高感度と高分離の理由について
- 6) 検量線の作成方法とサンプルに対する適応について
- 7) ラットの麻酔時間と血中濃度の関係について
- 8) クロロホルムの体内での毒性と代謝について
- 9) バックドカラムとキャピラリーカラムの長所と短所について
- 10) 本分析法の長所と短所について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 松 島 肇

副査 市 山 新 副査 梅 村 和 夫